

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 6 : C07K 16/28, A61K 39/395, G01N 33/577, C12P 21/08		A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/08576 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 30. März 1995 (30.03.95)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP94/03175 (22) Internationales Anmeldedatum: 22. September 1994 (22.09.94) (30) Prioritätsdaten: P 43 32 256.5 22. September 1993 (22.09.93) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: LIPP, Martin [DE/DE]; Trappen- reustrasse 23, D-80339 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): FÖRSTER, Reinhold [DE/DE]; Stübgen 57, D-81357 München (DE). EM- RICH, Thomas [DE/DE]; Blombergstrasse 9, D-82393 Iffeldorf (DE). WOLF, Ingrid [DE/DE]; Thalkirchnerstrasse 143, D-81371 München (DE). KREMMER, Elisabeth [DE/DE]; Untere Hauptstrasse 28, D-85354 Freising (DE). (74) Anwalt: MÜLLER-BORÉ & PARTNER; Isartorplatz 6, D- 80331 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i>	
(54) Title: MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST LEUKOCYTE-SPECIFIC G-PROTEIN-COUPLED RECEPTORS (54) Bezeichnung: MONOKLONALE ANTIKÖRPER GEGEN LEUKOZYTEN-SPEZIFISCHE G-PROTEIN-GEKOPPELTE REZEP- TOREN (57) Abstract <p>Monoclonal antibodies against leukocyte-specific G-protein-coupled receptors (L-GCR) are disclosed. These antibodies may be produced by the following steps: (a) introduction of a L-GCR coding nucleic acid into cells and expression of L-GCR; (b) immunisation of animals with L-GCR-expressing cells (a); and (c) fusion of spleen cells from the immunised animals (b) with myeloma cells and production of monoclonal L-GCR antibody-producing hybridoma cells. Also disclosed is a process for producing such antibodies, their use and kits containing the same, as well as a process for producing monoclonal GCR antibodies.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper gegen Leukozyten-spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (L-GCR). Diese Antikörper sind durch folgende Verfahrensschritte erhältlich: (a) Einführung einer L-GCR-codierenden Nukleinsäure in Zellen und Expression von L-GCR, (b) Immunisierung eines Tieres mit L-GCR-exprimierenden Zellen von (a), und (c) Fusion von Milzzellen des immunisierten Tieres von (b) mit Myelomzellen und Erhalt von monoklonale L-GCR-Antikörper-produzierenden Hybridomzellen. Ferner betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung solcher Antikörper, ihre Verwendung und sie enthaltende Kits. Desweiteren betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung monoklonaler GCR-Antikörper.</p>			

AL

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauritanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Monoklonale Antikörper gegen Leukozyten-spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Die Erfindung betrifft monoklonale Antikörper gegen Leukozyten-spezifische G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung sowie sie enthaltende Kits. Ferner betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern gegen G-Protein gekoppelte Rezeptoren.

Es ist bekannt, daß bei der Transduktion von Signalen in einem Organismus Rezeptoren eine entscheidende Rolle spielen. Nach Bindung der Liganden an Zellmembran-integrierte Rezeptoren wird das Signal über verschiedene Mechanismen intrazellulär weitergeleitet und verarbeitet. Es gibt verschiedene Familien dieser Rezeptoren, die sich durch bestimmte Strukturmerkmale unterscheiden. Die sogenannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, international abgekürzt als GCR (G protein-coupled receptors), werden in eine Familie zusammengefaßt. Das G-Protein ist ein heterotrimärer GTP-bindender Proteinkomplex, der aus den drei Untereinheiten G-alpha, G-beta und G-gamma aufgebaut ist. Es reguliert zelluläre Aktivitäten durch Austausch von GDP gegen GTP an seiner alpha-Untereinheit und aktiviert bzw. inaktiviert somit eine Reihe von Effektoren, wie Adenylylcyclasen, Phosphodiesterasen, Phospholipasen und Ionenkanäle. Als Vertreter von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren werden Rezeptoren für Hormone und Neurotransmitter angesehen. Zu ihnen gehören adrenerge und muscarinerge Rezeptoren wie auch Rezeptoren für Dopamin, der Substanz P, Thyreotropin, Morphin u. a..

Desweiteren ergeben sich zunehmend Hinweise, daß G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auch an der Regulation der Aktivierung, Hemmung, Migration und Zell-Zell-Interaktion immunkompetenter Zellen beteiligt sind. Es ist bekannt, daß die Aktivierung von Leukozyten durch Entzündungsmediatoren, wie formyl-MLP, Anaphylatoxin C5a, Prostaglandine, Interleukin-8, MIP-1 α und MIP-1 β sowie RANTES, ebenfalls über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren erfolgt. Eine Blockierung dieser Rezeptoren würde eine Entzündungshemmung bewirken. Mittel hierfür wurden jedoch

bisher noch nicht gefunden.

Der Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, Mittel bereitzustellen, mit denen Leukozyten-spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren blockiert werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch Bereitstellung monoklonaler Antikörper gegen Leukozyten-spezifische G-Protein gekoppelte Rezeptoren (L-GCR) erreicht. Diese Antikörper sind durch folgende Verfahrensschritte erhältlich:

- (a) Einführung einer L-GCR-codierenden DNA in Zellen und Expression von L-GCR,
- (b) Immunisierung eines Tieres mit L-GCR-exprimierenden Zellen von (a), und
- (c) Fusion von Milzzellen des immunisierten Tieres von (b) mit Myelomzellen und Erhalt von monoklonale L-GCR-Antikörper-produzierenden Hybridomzellen.

Die L-GCR-codierende Nukleinsäure kann eine DNA, insbesondere eine genomische oder eine cDNA sein. Ferner kann sie eine RNA sein. Die Nukleinsäuren können durch übliche aus der Literatur bekannte Verfahren bereitgestellt werden (vgl. z.B. Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1982); Lipp et al., Eur. J. Immunol. 22 (1992), 2795-2799).

Erfindungsgemäß können in die L-GCR-codierende Nukleinsäure Modifikationen, wie Additionen, Deletion und/oder Substitution von ein oder mehr Basen eingeführt werden. Additionen umfassen Markersequenzen, die z.B. an das 5'-Ende oder 3'-Ende der L-GCR-codierenden Nukleinsäure fusioniert werden. Solche Markersequenzen sind z.B. Codons, die für ein Protein bzw. Proteinfragment codieren, gegen das in monoklonaler Antikörper existiert. Mit letzterem kann die Expression des Proteins bzw.

Proteinfragments und damit auch die von L-GCR nachgewiesen werden (vgl. von Zastrow und Kobilka, J. Biol. Chem. 267 (1992), 3530-3538; von Zastrow et al., J. Biol. Chem. 268 (1993), 763-766; T. Emrich, M. Lipp, unveröffentlicht). Markersequenzen können auch in die für L-GCR codierende Nukleinsäure, z.B. in die für die extra-zellulären oder intra-zellulären Domänen codierenden Sequenzen, eingefügt werden. Weitere Additionen sind Sequenzen, die eine Lokalisierung von L-GCR in der Zellmembran von L-GCR-exprimierenden Zellen gewährleisten. Solche Sequenzen können für Signalpeptide, Membranproteine oder Fragmente davon codieren. Üblicherweise werden sie an das 5'-Ende der L-GCR-codierenden Nukleinsäure fusioniert.

Erfindungsgemäß kann die L-GCR-codierende Nukleinsäure in einer Expressionseinheit vorliegen. Diese umfaßt die für die Transkription und Translation der L-GCR-codierenden Nukleinsäure notwendigen Sequenzen, wie Promotor-, Enhancer-, Ribosomenbindungs-, Transkriptionsstart- und stop- sowie Translationsstart- und stop-Sequenzen. Die Expressionseinheit kann ferner in einem Vektor vorliegen. Dies kann auch ein Virus sein. Dem Fachmann ist bekannt, welche der Sequenzen der Expressionseinheit in welcher Anordnung notwendig sind, um L-GCR in bestimmten Zellen exprimieren zu können. Desweiteren weiß der Fachmann, welche Vektoren für welche Zellen geeignet sind.

Erfindungsgemäß wird die L-GCR-codierende Nukleinsäure in Zellen eingeführt, um L-GCR zu exprimieren. Hierfür können übliche aus der Literatur bekannte Verfahren und Bedingungen zur Transfektion von Zellen mit Nukleinsäure angewandt werden. Beispiele sind das Calciumphosphat-Präzipitations-, das DEAE-Dextran-, das Elektroporations- und das Lipidvesikel-Verfahren. Günstigerweise wird das Calciumphosphat-Präzipitationsverfahren angewandt, wobei etwa $1-2 \times 10^6$ Zellen mit etwa 15 μg L-GCR-codierender Nukleinsäure transfiziert werden. Als Zellen können eukaryotische und prokaryotische Zellen verwendet werden. Bevorzugt sind eukaryotische Zellen, insbesondere Säuge-

tier-, z.B. CHO-, COS- und 293-Zellen, Hefe- und Insektenzellen. Die Zellen sind dem Fachmann bekannt und allgemein erhältlich. Die Expression von L-GCR kann indirekt nachgewiesen werden, z.B. durch Nachweis der Expression von Markersequenzen, die von der L-GCR-codierenden Nukleinsäure umfaßt werden, oder durch Ligandenbindung. Der Nachweis kann mittels üblicher, aus der Literatur bekannter Verfahren, z.B. der Immunfluoreszenz, der Immunenzymologie, der ELISA-Technik, der Durchflußcytometrie und den Ligandenbindungstests erfolgen.

Erfindungsgemäß wird ein Tier mit L-GCR-exprimierenden Zellen immunisiert. Hierfür können übliche aus der Literatur bekannte Bedingungen gewählt werden. Günstigerweise werden ca. 3×10^7 -Zellen einem Tier zweimal verabreicht, wobei etwa 28 Tage zwischen den Verabreichungen liegen. Als Tiere können übliche Versuchstiere, insbesondere Ratten, Hamster, Kaninchen und Mäuse, verwendet werden. Als besonders günstig sind Ratten zu erwähnen.

Erfindungsgemäß werden dem immunisierten Tier Milzzellen entnommen. Dies kann in üblicher und bekannter Weise erfolgen. Günstigerweise werden Milzzellen ca. 60 Stunden nach der zweiten Verabreichung des Antigens dem Tier entnommen. Sie werden dann mit Myelomzellen mittels PEG fusioniert. Hierfür können übliche aus der Literatur bekannte Bedingungen verwendet werden. Günstigerweise werden als Myelomzellen solche der Mäuse-Myelomzelllinie X63-Ag8.653 (Kearney et al., J. Immunol. 123 (1979), 1548-50) verwendet und das Verhältnis der Milzzellen zu den Myelomzellen beträgt etwa 1 : 3. Etwa 1 Woche nach Fusion werden die Überstände der fusionierten Zellen auf Antikörperproduktion getestet. Hierfür können übliche aus der Literatur bekannte Verfahren durchgeführt werden. Günstigerweise wird eine Durchflußcytometrie durchgeführt. In ihr werden Vergleichsmessungen der Hybridomzell-Überstände auf Zellen durchgeführt, die mit L-GCR-codierender Nukleinsäure transfiziert worden bzw. unverändert (nicht transfiziert) sind. Antikörper-produzierende Hybridomzellen werden dann durch übliche

aus dem Stand der Technik bekannte Verfahren, z.B. der Limiting Dilution-Technik, kloniert.

Eine solche den Antikörper RF8B2 produzierende Hybridomzelle wurde am 8. Sept. 1993 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Mascherodeweg 1b, 38124 Braunschweig (DSMZ) unter der Hinterlegungsnummer DSM ACC 2153 hinterlegt.

Die erfindungsgemäßen L-GCR-Antikörper eignen sich für diagnostische Maßnahmen, insbesondere für die Bestimmung des Immunstatus eines Patienten. Hierfür werden sie z.B. mit Fluorochromen oder Biotin markiert und zusammen mit anderen markierten, allgemein erhältlichen T-Zell- bzw. B-Zell-spezifischen Antikörpern und Körperflüssigkeiten des Patienten inkubiert. Es wird der Anteil an T-Zellen, Gedächtnis-T-Zellen, T-Helfer-, und T-Helfer,-Zellen bzw. rezirkulierenden, nicht aktivierten B-Zellen bestimmt. Dies ermöglicht eine Aussage über den Immunstatus des Patienten. Ferner können die erfindungsgemäßen L-GCR-Antikörper zum Nachweis von Erkrankungen, insbesondere von Tumoren, Leukämien, Lymphomen, Immunschwächen und Autoimmunerkrankungen verwendet werden.

Desweiteren eignen sich die erfindungsgemäßen L-GCR-Antikörper für therapeutische Maßnahmen. Durch Bindung an den Rezeptor beeinflussen sie die Bindung des physiologischen Liganden oder führen durch ihre Bindung selbst zu einer Aktivierung oder Hemmung des Rezeptors. Die erfindungsgemäßen Antikörper eignen sich zur Hemmung von Entzündungen und zur Reduzierung der B- und T-Zellaktivierung. Sie können ferner die Migration und Interaktion von Zellen beeinflussen. Desweiteren eignen sich die erfindungsgemäßen Antikörper, allein oder in Kombination mit anderen Antikörpern (z.B. gegen Adhäsionsmoleküle) oder Therapeutika, eine Tumormetastasierung zu unterdrücken. Durch Hemmung der Ligandenbindung an L-GCR wird eine Reduzierung der Aktivierung von Adhäsionsmolekülen bewirkt, was entscheidend die Tumormetastasierung hemmt.

Darüberhinaus können die erfindungsgemäßen Antikörper mit bekannten Zelltoxinen, z.B. Ricin, oder Therapeutika gekoppelt werden, wodurch entartete Zellen selektiv behandelt werden können. Nach Bindung der Antikörper kommt es zur Internalisierung des Rezeptor-Komplexes und mithin zur effektiven Aufnahme des gekoppelten Toxins oder der Therapeutika. Der vorstehend genannte Antikörper RF8B2 ist hierfür besonders geeignet, da er der Subklasse IgG_{2b} angehört, die bekannterweise äußerst gering immunogen ist.

Die erfindungsgemäßen Antikörper werden für die Verabreichung in therapeutischen Maßnahmen, z.B. als Medikament, in üblicher Weise konfektioniert.

Erfindungsgemäß wird auch ein Kit bereitgestellt, der sich zur Durchführung vorstehend angesprochener diagnostischer Maßnahmen eignet. Ein solcher Kit enthält

- markierten L-GCR-Antikörper, übliche Waschpuffer und ggfs. ein der Markierung entsprechendes Substrat sowie ggfs. einen weiteren markierten Antikörper.
oder
- markierten L-GCR-Antikörper und markierten T-Zell-spezifischen Antikörper und/oder B-Zell-spezifischen Antikörper sowie übliche Waschpuffer und ggfs. ein der Markierung entsprechendes Substrat sowie ggfs. einen weiteren markierten Antikörper.

Ergänzend wird ausgeführt, daß in Schritt (a) des vorstehenden Verfahrens zur Herstellung von L-GCR-Antikörpern die L-GCR-codierende Nukleinsäure durch eine Nukleinsäure ersetzt werden kann, die für einen anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptor (GCR), z.B. einen Hormon- oder Neurotransmitter-Rezeptor codiert. Dies führt dann zur Expression von GCR in Zellen und weiter nach Immunisierung eines Tieres mit solchen Zellen und Fusion von Milzzellen des immunisierten Tieres mit Myelomzellen zu Hybridomzellen, die monoklonale GCR-Antikörper produzieren. Erfindungsgemäß wird also auch ein Verfahren bereit-

gestellt, das sich zur Herstellung monoklonaler Antikörper gegen G-Protein-gekoppelte Rezeptoren eignet.

Schließlich wird darauf hingewiesen, daß anstelle der Schritte (a) und (b) des vorstehenden Verfahrens zur Herstellung von L-GCR- bzw. GCR-Antikörpern die Nukleinsäure direkt in ein Tier zur Expression von L-GCR bzw. GCR eingeführt werden kann, wodurch das Tier immunisiert wird. Ferner kann anstelle der Fusion von Schritt (c) ein anderes aus dem Stand der Technik bekanntes Verfahren zur Immortalisierung von Milzzellen verwendet werden.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1

Konstruktion eines Plasmids zur Expression von L-GCR in eukaryotischen Zellen.

Eine für L-GCR-codierende cDNA (vgl. Lipp et al., Eur. J. Immunol. (1992) 22, 2795-2799) wurde in die Restriktionsschnittstellen EcoRI und XbaI des bekannten und allgemein erhältlichen prokaryotischen Klonierungsvektors pBluescript II KS+ eingefügt, wobei zuvor folgende Modifizierungen vorgenommen wurden. Im 5'-untranslatierten Bereich wurde mittels eines synthetischen Oligonukleotids 10 Basenpaare vor dem Translationsstartcodon eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease EcoRI eingefügt und der Bereich vor dem Translationsstartcodon derart verändert, daß eine effiziente Initiation der Translation erfolgt (vgl. Kozak M., Cell (1986) 44, 283-292). Das Translationsstopcodon wurde mittels Polymerasekettenreaktion entfernt und die L-GCR-codierende DNA mit einem synthetischen Oligonukleotid derart rekombiniert, daß auf Proteinebene an den Carboxy-Terminus des L-GCR-Proteins die Aminosäuresequenz PGGSGPEQKLISEEDLL fusioniert wurde. Die Sequenz der letzten 11 Aminosäuren stammt aus dem MYC-Protein und wird vom monoklonalen Antikörper 9E10 erkannt (vgl. Bishop, J.M. et

al., Mol.Cell.Biol.5 1985),3610-3616; Munro S., Cell 46 (1986), 291-300), während die ersten sechs Aminosäuren als Abstandshalter dienen, um eine ungestörte Faltung des MYC-Epitops zu ermöglichen. Die erhaltene rekombinante DNA wurde in die Restriktionsschnittstellen HindIII und XbaI des bekannten und allgemein erhältlichen eukaryotischen Expressionsvektors Rc/CMV, der die Expression mittels eines heterologen CMV-Promotors ermöglicht, eingefügt. Es wurde das mit pBLR1-MYC, bezeichnete Plasmid erhalten.

Beispiel 2

Expression von L-GCR in eukaryotischen Zellen.

Zur Expression von L-GCR in Eukaryoten wurde die humane embryonale Nierentumorzelllinie 293 (ATCC CRL 1573) verwendet. Hierzu wurden ca. $1-2 \times 10^6$ Zellen mit 15 μ g des Plasmids von Beispiel 1 mittels Calciumphosphat-Präzipitationstechnik transfiziert. Die Plasmid-DNA wurde zuvor aus den transformierten Bakterien über Ionenaustauschchromatographie isoliert. Zur Etablierung stabil exprimierender Zelllinien wurden Antibiotika-resistente Zellen des Transfektionsansatzes durch Zusatz von Neomycin (200 μ g/ml) angereichert und in der Expression des L-GCR-MYC-Fusionsproteins wurden positive Zelllinien durch Einzelzellverdünnung isoliert. Die Kontrolle der Expression des Fusionsproteins erfolgte sowohl bei transient als auch bei stabil transfizierten Zellen mittels Durchflußcytometrie an permeabilisierten Zellen unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 9E10.

Beispiel 3

Herstellung monoklonaler Antikörper

Immunisierung einer Ratte

Weibliche, acht Wochen alte, Lou/C Ratten wurden mit je 3×10^7 lebenden L-GCR-transfizierten 293-Zellen immunisiert. Nach 28 Tagen erfolgte der Booster mit der gleichen Menge des Immogens.

Zellfusion

60 Stunden nach der letzten Immunogenverabreichung wurde die Fusion in üblicher Weise durchgeführt (vgl. z.B. Köhler G. und C. Milstein, Nature 256 (1975), 495-497). Hierbei wurde der immunisierten Ratte unter sterilen Bedingungen die Milz entnommen, durch ein Sieb zerrieben und die gewonnenen Zellen wurden im Verhältnis 1:3 mit Zellen der Mäuse-Myelomzelllinie X63-Ag8.653 (Kearney et al., J. Immunol. 123 (1979) 1548-1550) mit Hilfe von PEG fusioniert. Eine Woche nach der Aussaat in Flachbodenplatten in HAT-Selektivmedium wurde das Koloniewachstum protokolliert und die Zellkulturüberstände koloniehaltiger Vertiefungen wurden im Durchflußcytometer (vgl. nachstehend) vergleichend auf stabilen L-GCR-exprimierenden 293 Zellen und normalen 293 Zellen auf das Vorhandensein L-GCR-spezifischer Antikörper getestet. Nur solche Antikörper, die an transfizierten Zellen gebunden haben, nicht jedoch an normalen 293 Zellen, wurden nach der Limiting dilution-Technik kloniert, weitervermehrt, auf transient transfizierten 293 Zellen und schließlich auf peripheren Leukozyten getestet.

Durchflußcytometrie

Das Vorhandensein von L-GCR-Antikörpern wurde mittels Durchflußcytometrie getestet. Als Testsystem wurden vergleichende Messungen an L-GCR-transfizierten und unveränderten 293 Zellen durchgeführt. Je 25 μ l Hybridomzellen-Überstand wurden mit 25 μ l der jeweiligen Zellsuspension (1×10^7 /ml) für 25 min bei RT inkubiert. Nach Waschen in PBS (4% FKS, 5 mM EDTA) wurden die Zellen mit einer 1:160 Verdünnung eines polyklonalen Ziegenanti-Ratte-FITC Konjugates versetzt. Nach 25-minütiger Inkubation und anschließendem Waschen erfolgte der Nachweis einer

spezifischen Bindung mittels eines FACScan Durchflußcytometers. Je Probe wurden 5000 Zellen gemessen und die Fluoreszenzintensität der Zellpopulation wurde analysiert. Durch den Vergleich der Fluoreszenzintensität von transfizierten und unveränderten 293 Zellen konnten solche Antikörper identifiziert werden, die spezifisch an L-GCR binden.

Bindungsstudien des erfindungsgemäßen Antikörpers RF8B2

Vorstehend angegebene 293 Zellen wurden mit L-GCR codierender DNA in üblicher Weise transfiziert bzw. nicht transfiziert. Letztere Zellen wurden als mock-transfiziert bezeichnet. Der erfindungsgemäße Antikörper RF8B2 wurde in üblicher Weise mit Biotin markiert und den Zellen zugegeben. Es zeigte sich, daß RF8B2 an transfizierte 293 Zellen bindet, nicht jedoch an mock-transfizierte (vgl. Fig., A).

Desweiteren wurden periphere Leukozyten des Blutes über Ficoll gereinigt und mit dem T-Zell-spezifischen Antikörper CD4-FITC (B) oder CD8-FITC (C) bzw. mit dem B-Zell-spezifischen Antikörper CD19-FITC (D) angefärbt. Anschließend wurde der Biotin-markierte Antikörper RF8B2 zugegeben. Es zeigte sich, daß 100% der B-Zellen (CD19-positiv) (D) diesen Antikörper binden. Hingegen wird RF8B2 nur von ca. 14% der T-Helfer-Zellen (CD4-positiv) (B), und ca. 2% der zytotoxischen T-Zellen (CD8-positiv) (C) gebunden (vgl. Fig., B, C und D). Dies zeigt die Verwendbarkeit von RF8B2, eine unterschiedlich starke Expression von L-GCR aufzuzeigen.

Produktion und Reinigung von Antikörpern

Probenpuffer	pH 7,4	PBS
Elutionspuffer	pH 2,5	0,05 M Glycin 0,05 M NaCl
10fach Tris-HCl-Puffer	pH 8,6	0,5M Tris 1,5M NaCl

Die Hybridomzellen wurden im RPMI mit 10% IgG-freiem FKS vermehrt, alle 2-3 Tage 1:3 geteilt und der Zellkulturüberstand wurde gesammelt. Zur Abtrennung der monoklonalen Antikörper aus dem Zellkulturüberstand wurde die Protein G-Affinitätschromatographie verwendet (vgl. Björck und Kronvall, J. Immunol. 132 (1984) 969-974). Hierzu wurde 1 g Protein G Sepharose 4 Fast Flow nach Quellung in eine Chromatographiesäule gepackt und mit PBS äquilibriert. 200 ml des zu reinigenden Überstandes wurden nach Mikrofiltration auf die Säule aufgebracht. Ein Wechsel von PBS auf Elutionspuffer löste die an die Sepharose gebundenen Antikörper. Die dem Extinktions-Peak entsprechenden Eluatfraktionen wurden gegen PBS-dialysiert.

Markierung von Antikörpern

Biotin-Markierung:

Kupplungspuffer	pH 7,4	PBS
Biotinpräparat	NHS-LC-Biotin	

Hierbei wurde die Kupplung mit Abwandlungen wie beschrieben, ausgeführt (vgl. z.B. Peters et al., Monoklonale Antikörper, Herstellung und Charakterisierung, Springer Verlag, Berlin (1985)). Protein G gereinigte Eluate wurden auf 2 mg/ml eingestellt und gegen Kupplungspuffer 24 Stunden dialysiert. Zur Reaktion wurden 50 µl Biotinlösung (8 mg Biotin in 1 ml DMF) zu 1,0 ml MAK-Lösung gegeben und 90 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach Dialyse gegen PBS- und Sterilzentrifugation wurden die Konjugate bei -20°C gelagert.

FITC-Konjugate:

Kupplungspuffer	pH 9,5	0.1M NaHCO ₃
-----------------	--------	-------------------------

FITCpräparat Fluoresceinisothiocyanat,
Protein G gereinigte Eluate wurden auf 2 mg/ml eingestellt und mit 1/10 Vol. 10fach Kupplungspuffer versetzt. Zur Reaktion wurden 60 µl FITC-Lösung (1mg FITC in 1 ml Kupplungspuffer) zu 1,0 ml MAK-Lösung gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Nach Dialyse gegen PBS- und Sterilzentrifugation wurden die Konjugate bei -20°C gelagert.

7. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die L-GCR-codierende Nukleinsäure in einer Expressionseinheit vorliegt.
8. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen eukaryotische Zellen umfassen.
9. Antikörper nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die eukaryotischen Zellen Säugetier-, Hefe- und Insektenzellen umfassen.
10. Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Tiere Ratten, Hamster, Kaninchen und Mäuse umfassen.
11. Verwendung des Antikörpers nach einem der Ansprüche 1 bis 10 für diagnostische oder therapeutische Maßnahmen.
12. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die diagnostischen Maßnahmen die Bestimmung des Immunstatus eines Patienten sowie den Nachweis von Tumoren, Leukämien, Lymphomen, Immunschwächen und Autoimmunerkrankungen umfassen.
13. Verwendung nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die therapeutischen Maßnahmen die Beeinflussung der Funktion von Blutzellen, z.B. die Hemmung von Entzündungen, und die Unterdrückung einer Tumormetastasierung umfassen.
14. Kit, enthaltend
 - markierten L-GCR-Antikörper nach einem der Ansprüche 1 bis 10, übliche Waschpuffer und ggfs. ein der Markierung entsprechendes Substrat sowie ggfs. einen weiteren markierten Antikörper oder
 - markierten L-GCR-Antikörper nach einem der Ansprüche

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 94/03175

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C07K16/28 A61K39/395 G01N33/577 C12P21/08

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 6 C07K A61K G01N C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE-SEYLER, vol.373, no.9, September 1992, BRD page 840 I. WOLF ET AL. 'Differentiation-specific expression of a novel G protein-coupled receptor from Burkitt's lymphoma.' see abstract	1-15
A	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, vol.22, no.11, November 1992, WEINHEIM, BRD pages 2795 - 2799 T. DOBNER ET AL. 'Differentiation-specific expression of a novel G protein-coupled receptor from Burkitt's lymphoma.' --- -/--	1-15

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☐ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- 'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- 'E' earlier document but published on or after the international filing date
- 'L' document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- 'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- 'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- 'T' later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- 'X' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- 'Y' document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- 'Z' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

2 January 1995

Date of mailing of the international search report

23 -01- 1995

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 3818 Patentlaan 2
NL - 2240 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

NOOIJ, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 94/03175

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY, vol.40, no.3, May 1994, NOISY-LE-GRAND, FRANKREICH pages 413 - 419 T. EMRICH ET AL. 'Transmembrane topology of the lymphocyte-specific G-protein-coupled receptor BLR1: Analysis by flow cytometry and immunocytochemistry.' -----	1-15
P,X	BLOOD, vol.84, no.3, 1 August 1994, NEW YORK NY, USA pages 830 - 840 R. FÖRSTER ET AL. 'Expression of the G-protein-coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells.' -----	1-15
P,X	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, vol.196, no.3, 15 November 1993, DULUTH MN, USA pages 1496 - 1503 R. FÖRSTER ET AL. 'A general method for screening mAbs specific for G-protein coupled receptors as exemplified by using epitope tagged BLR1-transfected 293 cells and solid phase cell ELISA.' see the whole document -----	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Int. 'onales Aktenzeichen
PCT/EP 94/03175

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C07K16/28 A61K39/395 G01N33/577 C12P21/08

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)
IPK 6 C07K A61K G01N C12P

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	BIOLOGICAL CHEMISTRY HOPPE-SEYLER, Bd.373, Nr.9, September 1992, BRD Seite 840 I. WOLF ET AL. 'Differentiation-specific expression of a novel G protein-coupled receptor from Burkitt's lymphoma.' siehe Zusammenfassung ---	1-15
A	EUROPEAN JOURNAL OF IMMUNOLOGY, Bd.22, Nr.11, November 1992, WEINHEIM, BRD Seiten 2795 - 2799 T. DOBNER ET AL. 'Differentiation-specific expression of a novel G protein-coupled receptor from Burkitt's lymphoma.' ---	1-15

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☐ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

'A' Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

'E' Älteres Dokument, das jedoch erst aus oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

'L' Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

'O' Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

'P' Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

'T' Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern zur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

'X' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

'Y' Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

'Z' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

2. Januar 1995

Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts

23 -01- 1995

Name und Postanschrift der Internationale Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2220 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bevollmächtigter

NOOIJ, F

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In: Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 94/03175

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	CELLULAR AND MOLECULAR BIOLOGY, Bd.40, Nr.3, Mai 1994, NOISY-LE-GRAND, FRANKREICH Seiten 413 - 419 T. ENRICH ET AL. 'Transmembrane topology of the lymphocyte-specific G-protein-coupled receptor BLR1: Analysis by flow cytometry and immunocytochemistry.' -----	1-15
P,X	BLOOD, Bd.84, Nr.3, 1. August 1994, NEW YORK NY, VSA Seiten 830 - 840 R. FÖRSTER ET AL. 'Expression of the G-protein-coupled receptor BLR1 defines mature, recirculating B cells and a subset of T-helper memory cells.' -----	1-15
P,X	BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS, Bd.196, Nr.3, 15. November 1993, DULUTH MN, VSA Seiten 1496 - 1503 R. FÖRSTER ET AL. 'A general method for screening mAbs specific for G-protein coupled receptors as exemplified by using epitope tagged BLR1-transfected 293 cells and solid phase cell ELISA.' siehe das ganze Dokument -----	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/EP 94/03175

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 1 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr. weil Sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Siehe Anlage.
2. ☐ Ansprüche Nr. weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr. weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche der internationalen Anmeldung.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Internationale Recherchenbehörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche der internationalen Anmeldung, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen enthalten:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Gebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Bemerkung : Obwohl die Ansprüche 11-13 (alle teilweise, in soweit es ein in vivo verfahren betrifft) sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen oder sich auf ein Diagnostizierverfahren das am menschlichen/tierischen Körper vorgenommen wird beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und grundete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/zusammensetzung.